

联苯双酯衍生物对糖尿病肾病和肾功能的影响*

柳月娟¹ 李 旗¹ 田福玲¹ 高玲焕¹ 赵铭佳^{2**}

¹华北理工大学, 唐山 063210; ²唐山市妇幼保健院, 唐山 063003

[摘要] **目的** 探讨联苯双酯衍生物改善糖尿病肾病及肾功能的相关机制。**方法** 将 50 只 SPF 级 6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠分为对照组 15 只和糖尿病肾病模型组 35 只。对照组再分为正常对照组 (7 只) 以及对照给药组 (8 只), 糖尿病肾病模型组再分为模型组、低剂量给药组、中剂量给药组、高剂量给药组、白藜芦醇阳性药组 (各 7 只)。给药 8 周后取材。检测小鼠的基本参数和肾功能相关指标, 糖原染色实验检测肾组织糖原堆积情况, 天狼星红染色检测肾组织纤维化情况, 采用 Q-Exactive 质谱仪进行蛋白质组学分析。分析各比较组间各项指标的差异。**结果** 不同剂量联苯双酯衍生物均能显著降低小鼠空腹血糖 ($P < 0.05$)。中高剂量联苯双酯衍生物能显著降低小鼠血清中尿素氮和肌酐水平 ($P < 0.05$)。糖原染色实验提示不同剂量联苯双酯衍生物均能缓解小鼠肾脏糖原堆积。天狼星红染色实验显示不同剂量联苯双酯衍生物均能缓解小鼠肾脏的纤维化病变。蛋白质组学分析共鉴定出 5 032 种蛋白质, 并筛选出 104 个差异表达蛋白。**结论** 联苯双酯衍生物有可能成为治疗糖尿病及糖尿病肾病等相关并发症的潜在药物。

[关键词] 联苯双酯衍生物; 糖尿病肾病; 肾脏纤维化; 差异表达蛋白

doi: 10.3969/j.issn.1674-7593.2024.04.008

Effect of Bifendate Derivatives on Diabetic Nephropathy and Renal Function

Liu Yuejuan¹, Li Qi¹, Tian Fuling¹, Gao Linghuan¹, Zhao Mingjia^{2**}

¹North China University of Science and Technology, Tangshan 063210; ²Tangshan Maternity and Child Health Care Hospital, Tangshan 063003

** Corresponding author: Zhao Mingjia, email: 17456519@qq.com

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of bifendate derivatives in improving diabetic nephropathy and renal function. **Methods** Fifty SPF grade 6–8 week old C57BL/6J mice, of which, 15 were in the control group and 35 in the diabetic nephropathy model group. The mice in the control group were divided into a normal control group ($n = 7$) and a control administration group ($n = 8$), and the mice in the diabetic nephropathy model group were divided into model group, low-dose administration group, medium-dose administration group, high-dose administration group, and resveratrol-positive drug group (each had 7 mice). Samples were taken after 8 weeks of drug administration. The basic parameters and renal function related indexes of mice were detected, glycogen staining experiments detected the accumulation of glycogen in renal tissues, Sirius red staining detected the fibrosis of renal tissues, and proteomic analysis was performed by Q-Exactive mass spectrometer. The differences of the indexes between the comparison groups were analyzed. **Results** Different doses of bifendate derivatives significantly reduced fasting blood glucose in mice ($P < 0.05$). Medium and high doses of bifendate derivatives significantly reduced serum urea nitrogen and creatinine levels in mice ($P < 0.05$). Glycogen staining experiments suggested that different doses of benzene bilipid derivatives could alleviate the accumulation of glycogen in the kidneys of mice. Sirius red staining experiments showed that different doses of benzene bisabolol derivatives could alleviate the fibrotic lesions in the kidneys of mice. A total of 5 032 proteins were identified by proteomic analysis, and 104 differentially expressed proteins were screened. **Conclusion** Bifendate derivatives have the potential to be potential drugs for the treatment of diabetes mellitus and related complications such as diabetic nephropathy.

[Key words] Bifendate derivatives; Diabetic nephropathy; Renal fibrosis; Differentially expressed proteins

糖尿病肾病 (Diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见和最严重的并发症之一, 与糖尿病患者发病率和死亡率增加相关^[1-2]。严格控制血糖和血压已被证明无法阻止 DN 进展为终末期肾病和降低 DN 相关死亡率^[3-4]。提高对 DN 发病机制的认

识, 探索治疗 DN 的新策略具有重要意义。联苯双酯衍生物 (Bifendate derivatives, BD) 是以联苯双酯为前体合成的新型衍生物, 是五味子丙素的合成中间体, 五味子丙素是一种用于治疗肝炎的中药^[5]。据报道, 联苯双酯具有多种药理作用, 如抗

* 河北省自然科学基金 (H2019209565); 河北省中医药管理局科研计划项目 (2018175)

** 通讯作者: 赵铭佳, 电子邮箱 17456519@qq.com

病毒、抗氧化、免疫调节和抗癌等^[6-7]。基于上述研究,本研究对 BD 的抗氧化活性及其对 DN 的潜在治疗作用进行了探究。

1 材料与方法

1.1 材料

50 只 SPF 级 6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠购于集萃药康实验动物有限公司 [SCXK (沪) 2023-0031], 初始体质量 23~27 g, 饲养于 SPF 级动物房, 保持充足的食物和水以及恒温恒湿的饲养条件。链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ)、BD、白藜芦醇 (Resveratrol, Res) 及羧甲基纤维素钠购自 Sigma 公司, 肌酐、尿素氮生化检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所有限公司, 糖原染色、天狼星红染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, 戊巴比妥购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 动物造模及给药

小鼠适应性喂养 1 周后进行造模, 分为对照组 (15 只) 和 DN 模型组 (35 只)。DN 模型组禁食过夜后腹腔注射 50 mg/kg 的 STZ, 连续注射 5 d, 对照组注射等量生理盐水。最后一次注射 1 周后检测空腹血糖, 小鼠禁食 8~12 h 后测定体质量及空腹血糖, 连续 3 d 空腹血糖 > 11.1 mmol/L 为造模成功。

对照组 15 只分为两组: 正常对照 (NC) 组 7 只和对照给药 (NC + BD H, 40 mg/kg) 组 8 只, 其中对照给药组用于监测高剂量药物对小鼠的毒副作用。DN 模型组 35 只分为模型 (STZ) 组、低剂量给药 (STZ + BD L, 10 mg/kg) 组、中剂量给药 (STZ + BD M, 20 mg/kg) 组、高剂量给药 (STZ + BD H, 40 mg/kg) 组及 Res 阳性药 (STZ + Res, 40 mg/kg) 组, 每组 7 只。溶剂均为 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液, 成模后, NC 组和 STZ 组均给予等量溶剂灌胃, 其他各组均给予不同的药物灌胃, 连续给药 8 周后取材。

1.3 生化指标检测

小鼠血液在室温下 3 000 r/min 离心 15 min, 收集血清并分装存储于 -80 °C, 用于生化参数测量, 小鼠血液肌酐和尿素氮水平检测按照试剂盒说明书进行操作。

1.4 病理检测

按 50 mg/kg 腹腔注射 3% 戊巴比妥麻醉, 称重, 处死并迅速摘取两侧肾脏 (除去包膜), 用预冷的生理盐水冲洗, 然后用滤纸吸干。将一侧肾脏分成若干份, 部分置于 4% 多聚甲醛中固定。经包埋后进行 4 μm 厚度切片。按照糖原染色、天狼星红染色试剂盒说明书进行染色。然后检测小鼠肾脏糖原堆积和肾脏纤维化情况。

1.5 蛋白质组学检测

将 NC、STZ 和 STZ + BD H 这三个组的小鼠肾脏样品进行实验。每组选取 3 只不同小鼠肾脏组织, 经匀浆、裂解和蛋白浓度测定后, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳和助滤剂样品准备法酶解后进行串联质谱标签标记以及反相分级。样品经色谱分离后用 Q-Exactive 质谱仪进行质谱分析。通过 Mascot2.2 和 Proteome Discoverer1.4 软件对原始质谱数据进行鉴定及定量分析。

1.6 统计学方法

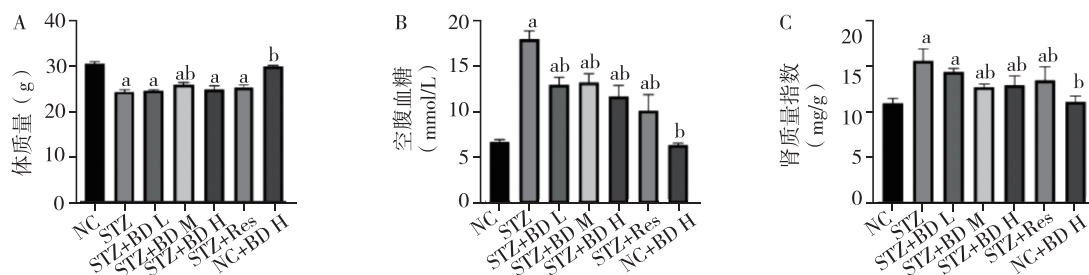
采用 Prism7.0 统计学软件进行数据分析, 正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (进一步比较采用 Tukey's 多重比较检验), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DN 小鼠模型建立以及药物对肾功能的影响

造模后, DN 模型组中各亚组的体质量低于 NC 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1A。STZ 组的空腹血糖高于 NC 组 ($P < 0.05$), DN 模型组中各给药亚组的空腹血糖均低于 STZ 组 ($P < 0.05$), 见图 1B。STZ 组的肾质量指数高于 NC 组 ($P < 0.05$), 模型组的 STZ + BD M 组、STZ + BD H 组、STZ + Res 组的肾质量指数低于 STZ 组 ($P < 0.05$), 见图 1C。STZ 组血清中肌酐和尿素氮水平较 NC 组有显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2A 和图 2B。

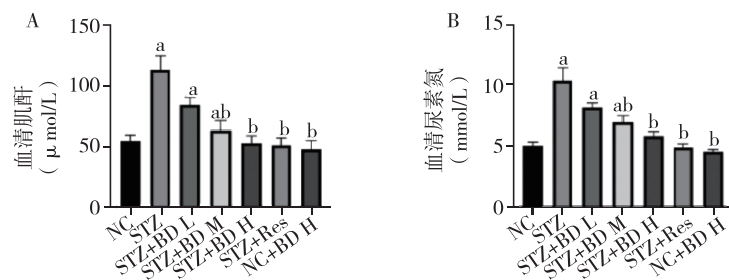
NC + BD H 组体质量高于 STZ 组, 空腹血糖、肾质量指数、血清中肌酐和尿素氮均低于 STZ 组 ($P < 0.05$), 但与 NC 组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 BD 对动物体质量, 血糖和肾功能无明显副作用。



注: 与 NC 组比较^a $P < 0.05$; 与 STZ 组比较^b $P < 0.05$

图 1 小鼠体质量、空腹血糖及肾质量指数比较

Fig. 1 Comparison of mice body weight, fasting blood glucose and renal mass index



注: 与 NC 组比较^a $P < 0.05$; 与 STZ 组比较^b $P < 0.05$

图 2 小鼠血清肌酐和血清尿素氮比较

Fig. 2 Comparison of mice on serum creatinine and serum urea nitrogen

2.2 肾脏纤维化检测结果

STZ 组肾脏中糖原堆积和天狼星红染色阳性区域均多于 NC 组, 说明 STZ 组肾脏发生了纤维化病变。

不同剂量 BD 给药后肾脏中的糖原堆积及天狼星红阳性染色区域均较 STZ 组有明显改善, 其中 STZ + BD H 组效果最好, 见图 3。

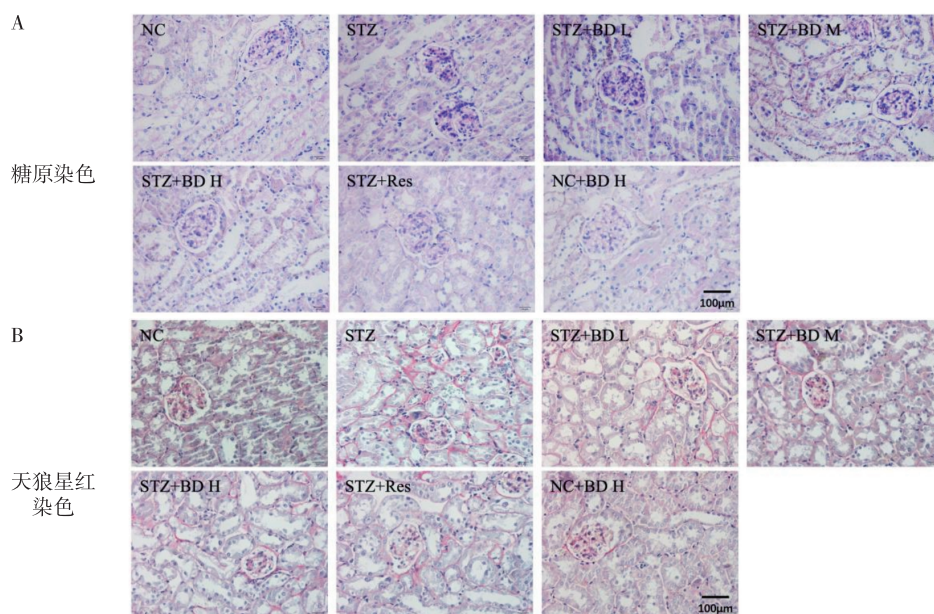


图 3 小鼠肾脏组织病理

Fig. 3 Mice kidney histopathology

2.3 蛋白质组学检测药物潜在作用靶点

蛋白质组学分析共鉴定出 5 032 种蛋白质, 差异蛋白检出结果见表 1。STZ 组和 NC 组差异表达蛋白与 STZ + BD H 组和 STZ 组差异表达蛋白取交集, 共得到 104 个共同差异表达蛋白, 见图 4。去除其中差异表

达方向不一致的蛋白, 选取变化最明显的前 10 位蛋白, 见表 2。炎症免疫相关蛋白纤维化相关蛋白在模型小鼠肾脏中表达显著升高而给药后显著降低。

表 1 蛋白质组学检测结果
Tab. 1 Results of proteomics assays

比较组别	上调	下调	合计
NC 组 vs STZ 组	343	247	590
STZ + BD H 组 vs STZ 组	72	126	198
STZ + BD H 组 vs NC 组	257	274	531

NC组vs STZ组 STZ+BD H组 vs STZ组

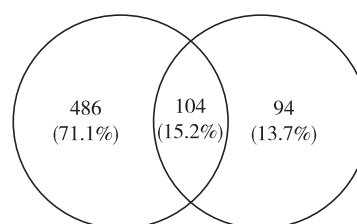


图 4 小鼠肾脏差异蛋白交集

Fig. 4 Intersection of mice kidney differential protein take

表 2 NC 组、STZ 组及 STZ + BD H 组间肾脏差异表达蛋白前 10 位

Tab. 2 Top 10 differentially expressed proteins in mice kidney among NC group, STZ group and high dose administration group

蛋白质编号	蛋白名称	STZ 组/NC 组	P 值	STZ + BD H 组/STZ 组	P 值
O70200	Allograft inflammatory factor 1	1.425	<0.001	0.824	<0.001
P01821	Ig heavy chain V region MC101	1.413	<0.001	0.578	<0.001
P11087	Collagen alpha-1(I) chain	1.413	<0.001	0.714	<0.001
P43276	Histone H1.5	1.409	<0.001	0.773	<0.001
Q01149	Collagen alpha-2(I) chain	1.408	<0.001	0.774	<0.001
P08071	Lactotransferrin	1.384	<0.001	0.710	<0.001
P19973	Lymphocyte-specific protein 1	1.374	<0.001	0.794	<0.001
P06800	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C	1.370	<0.001	0.816	<0.001
A2RSY6	TRMT1-like protein	1.355	<0.001	0.338	<0.001
O88271	Craniofacial development protein 1	1.354	<0.001	0.799	<0.001

注: STZ 组/NC 组表示 STZ 组蛋白表达量与 NC 组的比值, 该列均大于 1, 说明 STZ 组各指标大于 NC 组; STZ + BD H 组/STZ 组表示 STZ + BD H 组蛋白表达量与 NC 组的比值, 该列均小于 1, 说明 STZ + BD H 组各指标均小于 STZ 组

3 讨论

DN 是糖尿病最严重的慢性微血管并发症之一, 也是引起终末期肾病的主要原因^[8]。在全球范围内, 糖尿病的患病率呈上升趋势, 尤其是在老年人群中更加明显。美国的一项调查研究显示, 65 岁以上人群糖尿病患病率为 26.9%, 而且 65 岁以上糖尿病患者数量约占总患病人数的 40%^[9]。血糖控制不良、高血脂、吸烟、环境因素、遗传和表观遗传因素等是引发 DN 的主要诱因^[10]。本研究着重探讨通过药物缓解氧化应激, 进而改善肾脏纤维化。

联苯双酯是由人工合成的一类 BD, 其广泛应用于抗氧化、抗病毒等方面。随着近些年的不断探索, BD 作为新药研发的新兴领域愈发受到关注, 其中 AB-38b 能够通过抑制 Nrf2 相关的氧化应激, 改善 DN 及肾脏纤维化^[11]。衍生物 N-3 在乳腺肿瘤发生发展中起到关键作用, 可以有效抑制乳腺癌细胞的迁移和扩散^[12]。Res 通过其抗氧化活性, 在糖代谢和脂代谢等途径中发挥自由基清除等作用^[13]。Peng 等^[14]同样利用了 Res 的抗氧化功效, 通过化学修饰法, 进一步拓展了 Res 及其衍生物在护肤品和医药领域的潜在应用价值。本课题组基于对 BD 现有的研究, 对 DN 的治疗作用进行了进一步探讨, 结果显示, 通过给予不同剂量的 BD, 小鼠血糖有不同程度的降低, 其中高剂量给药组及阳性药组效果最好, 证明高剂量的 BD 与 Res 具有类似的降血糖功效; 同时 STZ 组的肾质量指数较 NC 组也有显著的升高, 中、高剂量给药组以及阳性药组较 STZ 组有显著降低, 证明 BD 在较高剂量时, 同 Res 具有相似的改善肾质量指数的作用。检测小鼠血清中肌酐和尿素氮水平, STZ 组血清中肌酐和尿素氮水平较 NC 组有显著升高, 表明 STZ 组肾功能受损, 而给药后各组的肌酐和尿素氮

均有一定程度的降低。上述结果表明, BD 能显著改善小鼠的肾功能, 其中高剂量给药组效果最好, 接近 Res 药效。有研究表明, BD 可以改善糖尿病大鼠肾病和脑病的症状, 其中衍生物 AB-38b 能够通过抑制 mTOR/AKT 通路的活性, 实现抗氧化, 降低糖原、胶原蛋白和基质蛋白堆积, 改善肾脏纤维化程度, 起到缓解 DN 的功效^[15]。已有研究报道 Res 可能是一种有效且安全的化合物, 用于预防和治疗衰老和与年龄相关的疾病^[16]。因此, 联苯双酯在治疗老年 DN 的研究可能具有一定的临床价值。但是, 关于 Res 和 BD 在改善 DN 和肾功能方面是否有联系还有待进一步研究。

为了进一步研究 BD 改善 DN 肾功能以及肾脏纤维化的作用机制, 本研究对各组小鼠进行了蛋白质组学分析。通过筛选差异表达蛋白, 并选取交集中差异方向一致的 10 个最显著差异蛋白, 包括炎症免疫相关蛋白和纤维化相关蛋白。上述蛋白在 DN 模型小鼠肾脏中表达显著升高而给药后显著降低, 表明 BD 改善 DN 小鼠肾脏功能和纤维化可能是通过调控炎症免疫相关蛋白表达实现的。2022 年更新的美国临床内分泌学协会临床实践指南中提到, 需要重视糖尿病患者的免疫系统相关并发症的预防和治疗^[17]。Rohm 等^[18]提出, 慢性系统性炎症可能导致远期期的糖尿病并发症, 包括非酒精脂肪肝、视网膜病变、心血管疾病、DN 等。同时越来越多的证据表明, 免疫系统异常是 DN 的一个诱因^[19]。免疫细胞激活炎症反应后, 促进自分泌和旁分泌因子的释放, 进而放大炎症并造成肾脏损伤。Pérez-Morales 等^[20]提出将 DN 作为一种炎症疾病的新观点, 以及将炎症信号通路及其下游产物作为新的生物标志物和潜在的治疗靶点。本研究涉及的免疫调节疗法——BD 法, 或许是糖尿病及其并发症等代谢性疾病的潜在治疗方

案。同时, 本研究为 DN 的治疗提供了新的思路。

综上所述, BD 作为一种新型合成化合物对 STZ 诱导的 2 型糖尿病小鼠具有良好的肾脏保护和抗纤维化作用。此外, 本研究通过蛋白质组学方法筛选潜在作用靶点, 进而证明的抗氧化和抗炎活性使其在 DN 治疗方面具有广阔的前景。

参考文献

- [1] Valencia W M, Florez H. How to prevent the microvascular complications of type 2 diabetes beyond glucose control [J]. *BMJ*, 2017, 356: i6505.
- [2] Jungmann E. Prevention and treatment of diabetic nephropathy in older patients [J]. *Drugs Aging*, 2003, 20 (6): 419–435.
- [3] Arora M K, Singh U K. Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update [J]. *Vascul Pharmacol*, 2013, 58 (4): 259–271.
- [4] Kopel J, Pena-Hernandez C, Nugent K. Evolving spectrum of diabetic nephropathy [J]. *World J Diabetes*, 2019, 10 (5): 269–279.
- [5] Abdel-Hameid N A. Protective role of dimethyl diphenyl bicarboxylate (DDB) against erythromycin induced hepatotoxicity in male rats [J]. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21 (4): 618–625.
- [6] El-Beshbishy H A. The effect of dimethyl dimethoxy biphenyl dicarboxylate (DDB) against tamoxifen-induced liver injury in rats: DDB use is curative or protective [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2005, 38 (3): 300–306.
- [7] He H J, Wang G Y, Gao Y, et al. Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice [J]. *World J Diabetes*, 2012, 3 (5): 94–104.
- [8] Sagoo M K, Gnudi L. Diabetic nephropathy: an overview [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2067: 3–7.
- [9] Abdelhafiz A H, Nahas M E, de Oliveira J M. Management of diabetic nephropathy in older patients: a need for flexible guidelines [J]. *Postgrad Med*, 2014, 126 (4): 171–177.
- [10] Papadopoulou-Marketou N, Paschou S A, Marketos N, et al. Diabetic nephropathy in type 1 diabetes [J]. *Minerva Med*, 2018, 109 (3): 218–228.
- [11] Du L, Wang J, Chen Y, et al. Novel biphenyl diester derivative AB-38b inhibits NLRP3 inflammasome through Nrf2 activation in diabetic nephropathy [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2020, 36 (3): 243–260.
- [12] Wang F, Liao R, Wang X, et al. N-3, a novel synthetic derivative of bifendate, inhibits metastasis of triple-negative breast cancer via decreasing p38-regulated FOXC1 protein stability [J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 215: 115729.
- [13] Oh W Y, Shahidi F. Lipophilization of resveratrol and effects on antioxidant activities [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65 (39): 8617–8625.
- [14] Peng H, Shahidi F. The Effects of acyl chain length on antioxidant efficacy of mono- and multi-acylated resveratrol: a comparative assessment [J]. *Molecules*, 2022, 27 (3): 1001.
- [15] Meng Q, Zhou J, You F, et al. A novel biphenyl diester derivative, AB38b, inhibits glioblastoma cell growth via the ROS-AKT/mTOR pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 194: 114795.
- [16] Zhou D D, Luo M, Huang S Y, et al. Effects and mechanisms of resveratrol on aging and age-related diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9932218.
- [17] Blonde L, Umpierrez G E, Reddy S S, et al. American association of clinical endocrinology clinical practice guideline: developing a diabetes mellitus comprehensive care plan-2022 update [J]. *Endocr Pract*, 2022, 28 (10): 923–1049.
- [18] Rohm T V, Meier D T, Olefsky J M, et al. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders [J]. *Immunity*, 2022, 55 (1): 31–55.
- [19] Tang S, Yiu W H. Innate immunity in diabetic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16 (4): 206–222.
- [20] Pérez-Morales R E, Del Pino M D, Valdivielso J M, et al. Inflammation in diabetic kidney disease [J]. *Nephron*, 2019, 143 (1): 12–16.

(2023-12-31 收稿)